

· 综述 ·

微生物转化技术在中药研究中的应用

牛红军^{1,2}, 王芃², 杨官娥^{1*}

(1. 山西医科大学药学院, 太原 030001; 2. 天津现代职业技术学院, 天津 300350)

[摘要] 通过文献整理对用于中药转化的微生物, 微生物转化技术在中药领域中的应用及微生物转化中药的反应机制进行了综述。微生物体内含有丰富的酶, 酶能催化中药成分发生水解反应、氧化还原反应、羟基化反应和糖基化反应等生理生化反应, 生成各类目标产物。微生物转化技术能增加天然活性先导化合物的来源, 增强中药的药效, 减弱中药的毒副作用, 把无效中药成分转化为有效成分, 促进中药活性成分吸收, 降低中药的生产成本, 为中药组分代谢机制研究提供辅助手段, 实现微生物转化技术应用于中药生产的目标。

[关键词] 微生物转化; 中药; 反应机制

[中图分类号] R283 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0346-04

[doi] 10.11653/syfy2013180346

Application of Microbial Transformation in Research of Chinese Medicine

NIU Hong-jun^{1,2}, WANG Peng², YANG Guan-e^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;
2. Tianjin Modern Vocational Technology College, Tianjin 300350, China)

[Abstract] Microbes can catalyze the hydrolyzation, redox reaction, hydroxylation and glycosylation of Chinese medicine. The unique advantages of microbial transformation in the research of Chinese medicine are that it can increase the source of natural active leading compounds, enhance the curative activity of traditional Chinese medicine, weaken the side effects of Chinese medicine, promote the absorption of active ingredients of Chinese medicine, reduce the production cost of traditional Chinese medicine and so on. Microbial transformation has become one of the focus in the research of Chinese medicine.

[Key words] microbial transformation; Chinese medicine; reaction mechanism

生物转化 (Biotransformation), 也称生物催化 (biocatalysis), 是利用动植物细胞或器官、微生物及其细胞器, 以及游离酶对外源性化合物进行改造和结构修饰而获得有价值产物的生理生化反应。生物转化的本质是利用生物体所产生的酶对外源化合物进行酶催化反应, 它具有反应选择性强 (位置选择性、立体选择性)、反应条件温和、副产物少和不造

成环境污染等特点^[1-2]。生物转化研究主要集中于微生物转化领域, 微生物具有生长周期短、繁殖速度快、适应能力强、含有丰富的各类酶系等特点, 常被用于中药成分的生物转化。微生物转化中药技术被广泛用于天然化合物的合成、结构修饰和改造、药物前体化合物的转化和药物代谢机制研究等^[3]。中药成分的微生物转化是人类获得结构新颖、独特、低成本、低毒性和高活性药物的重要途径之一^[4]。

1 常用的微生物

1.1 细菌、放线菌与真菌 细菌、放线菌和真菌常被用于转化中药组分^[5-6]。如二萜类化合物的转化既可由黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 和禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 等真菌完成, 也可由灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*)、淡紫灰链霉菌 (*Streptomyces*

[收稿日期] 20121231(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81173473); 山西省自然科学基金项目 (2010011048-2)

[第一作者] 牛红军, 硕士, 讲师、工程师, 从事生物制药研究, E-mail: hayaoshengwu@126.com

[通讯作者] * 杨官娥, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药生物转化机制研究, Tel: 0351-4690143, E-mail: yangguane@hotmail.com

lavendulea) 和诺卡氏菌 (*Nocardia sp.*) 等放线菌完成^[7-8]。

1.2 游离细胞与固定化细胞 中药生物转化一般采用游离细胞,而固定化细胞的应用也越来越多。固定化微生物技术是通过化学的或物理的手段将游离微生物细胞或酶定位于限定的空间区域内,使其保持活性并可以反复利用。该技术克服了微生物细胞太小,与水溶液分离困难,难以反复使用的弊端,具有微生物密度高、反应迅速、微生物流失少、产物易分离、反应过程易控制等优点^[9]。总三萜类化合物是槲寄生细胞毒活性的有效部位之一,侯晓峰等^[10]研究发现,经球形红细菌转化后,槲寄生中总三萜类化合物的含量会提高,并且发现固定化球形红细菌比游离球形红细菌更利于总三萜类化合物的生成。

1.3 生长细胞与静息细胞 生长状态的细胞酶活较高,常用于生物转化中药。静息细胞是有生命并保持酶活性,但不分裂或很少分裂的细胞,它的应用正逐渐增多。静息细胞转化法是将菌体培养一定时间后,用离心或过滤方法分离、收集菌体,并悬浮于不完全培养基或缓冲液中,在适当条件下加入底物进行转化的方法。静息细胞转化法的优势在于可自由改变转化体系中底物和菌体比例,提高转化效率^[11]。白桦脂酸具有广谱的生物学以及药理学活性,具有抗疟性、抗炎性、抗肿瘤活性和抗艾滋病活性,并且白桦脂酸的体内毒性很小或没有。白桦脂酸的获得多以自然界中丰富的白桦脂醇为前体,刘婧^[12]在利用黄绿蜜环菌生物催化白桦脂醇合成白桦脂酸的过程中发现,静息细胞对白桦脂醇的转化率较高,可合成白桦脂酸及其他三萜类衍生物。

1.4 野生菌和基因工程菌 野生菌催化存在以下问题:底物跨膜的通透性大小影响最终的转化率;副反应导致底物或产物的降解;存在旁路反应和副产物积累等^[13]。利用基因工程对天然酶进行定向改造或异源表达重组酶能够克服野生菌弊端,基因工程菌在转化领域正得到迅速应用。彭艳红^[14]等从能以1-苯基-2-甲氨基丙酮为底物专一性转化生成*d*-伪麻黄碱的菌株摩氏摩根菌中分离纯化出调控此生物转化过程的羰基还原酶,并利用基因工程手段使其在枯草芽孢杆菌中进行了高效的表达,成功实现了目标酶的生物转化功能,生成了*d*-伪麻黄碱。

2 微生物转化在中药领域的应用

2.1 增加天然活性先导化合物来源 以催化功能强大的微生物酶体系生物转化中药化学成分,从而产生新的天然化合物库,这是增加化合物种类的有

效手段。通过与药理筛选手段相结合,可以从生物转化产物中寻找适宜药用的天然活性先导化合物。

莪术醇具有抗癌、抗病毒、抗菌等作用,是莪术油主要药效成分之一。莪术醇的结构骨架为倍半萜半缩酮,易溶于极性较小的有机溶剂,但水溶性差,不宜作为临床用药。孙敏鸽等^[15]使用荨麻青霉对莪术醇进行生物转化,得到两种新产物,3- α -羟基莪术醇为新化合物,11-*R*-12-羟基莪术醇为首次通过该菌生物转化莪术醇得到。生物转化法为新化合物的生成开辟了一条新的道路。

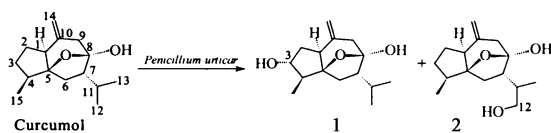


图1 莪术醇的荨麻青霉生物转化反应

2.2 提高中药药效 生物转化后,中药活性组分含量增加或有高活性化合物生成,药效得到提高。白藜芦醇是虎杖药材中的活性成分,具有抗氧化、抗肿瘤、动脉粥样硬化等多种生物学活性,但虎杖中白藜芦醇多以苷形式存在。游松等^[16]采用多种微生物进行白藜芦醇苷转化研究,筛选到1株能高效地转化白藜芦醇苷的丝状真菌 (*Syncephalastrum racemosum* 3.264),并纯化得到质量分数为98%的白藜芦醇,该方法提供了获得白藜芦醇的新途径,具有实际应用价值。喜树碱(CPT)和10-羟基喜树碱(HCPT)是喜树中含有的天然抗肿瘤活性成分,HCPT比CPT的抗肿瘤效果好,且毒性较低,已上市成为抗癌药物。但HCPT在喜树种子内的天然含量仅为1/10万,如何将CPT改造和结构修饰成活性更强的HCPT是个难题。郭继强等^[17]发现假单胞菌对CPT有较高的转化功能,在适宜条件下,CPT的转化成HCPT的产率达19.1%。

2.3 减弱中药毒副作用 雷公藤是一种民族民间植物药,药理活性多种多样,广泛用于风湿痹痛、关节僵硬、腰膝疼痛和屈伸不利等,现代研究表明,雷公藤诸多成分还具有一定的抑制肿瘤活性。但雷公藤的多种有效成分同时也可能是毒性成分,因此现行的方法难以从根本上解决雷公藤的毒性问题。研究表明,利用药用真菌对雷公藤中各种有机质进行分解和转化,可使成分及成分间的比例发生改变,生物转化产物的毒性明显降低^[18]。生物转化后,毒性成分被修饰或含量降低,毒副作用减弱。附子具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛等功效,被称为“回阳救逆第一品药”,但其主要功效和毒性成分均为口服2~4 mg即能致死的乌头碱等双酯型二萜类生

物碱,孙鹏等^[19]发现黑曲霉发酵后的附子中生成了苯甲酰乌头原碱等毒性小的活性物质,而乌头碱、新乌头碱含量明显降低,毒性得到显著下降。

2.4 无效中药成分转化为有效成分 人参皂苷类的抗变态反应活性可通过抑制 RBL-2H3 细胞释放 β -氨基己糖苷酶的能力来评价。人参皂苷 Rc 无此活性,而其多种人肠道菌代谢产物具有此抑制作用,其中人参皂苷 Mc 和化合物 K 抑制活性最强, IC_{50} 分别为 30, 24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 活性强于临床用药色甘酸钠 (IC_{50} 为 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[20]。

2.5 促进中药活性成分吸收 中药成分在肠道内通常难以被吸收,生物利用度低,但在肠内滞留期间易被肠道菌群生物转化成苷元而被吸收,在体内发挥药理作用。甘草酸在肠道内难以直接吸收,但会与肠道菌群作用产生 18 α -甘草次酸的中间产物,并最终代谢为甘草次酸而被机体吸收,发挥药理活性^[21]。

2.6 降低生产成本 随着菌种选育技术和基因工程技术的进步,酶的大量体外表达已经成为可能,大大降低了药物生产成本。麻黄碱是一种从天然植物麻黄草中分离而得到的芳香族氨基醇衍生物,其立体异构体 *l*-麻黄碱和 *d*-伪麻黄碱,分别主要用作支气管扩张剂和解充血剂,具有较强的药理作用。彭艳红等^[14]利用 *Bacillus subtilis* 生物转化生产 *d*-伪麻黄碱,重组 *B. subtilis* 在葡萄糖存在的情况下能够催化底物 1-苯基-2-甲氨基丙酮转化生成 *d*-伪麻黄碱,底物摩尔转化率为 24.1%。该方法克服了化学合成法原料来源有限、生产成本低和异构体分离困难、环境污染等问题,是大规模生产麻黄碱的理想途径之一。

2.7 提供中药组分代谢机制研究辅助手段 很多药物在微生物内与在哺乳类动物体内的代谢机制相似,特别是真菌,具有与哺乳动物药物代谢酶功能非常相似的细胞色素 P450 酶系和葡萄糖苷酸酶等,可进行某些与哺乳动物相同的 I 相与 II 相药物代谢反应。微生物转化体系有开发成预测药物代谢及毒理学体外模型的潜力^[22]。郭永超等^[23]选取小克银汉霉菌对马兜铃酸 A (Aristolochic acid) 进行代谢转化,得到马兜铃酸 A 的 O 去甲基化物,该产物和哺乳动物在摄入马兜铃酸 A 后的代谢产物结构相同。该实验初步证明利用小克银汉霉菌转化马兜铃酸 A 能得到与哺乳动物代谢相同的某些产物,可以作为研究马兜铃酸 A 代谢途径的一个体外模型。

3 微生物转化中药的反应机制

微生物转化中,反应底物有时发生单一酶催化

的一步反应,有时在各种酶协同作用下发生复杂的多步骤催化反应。最常见的反应是水解反应,其次是氧化还原反应,常见的还有羟基化反应、糖基化反应、甲基化/去甲基化反应和开环反应等。

3.1 水解反应 薯蓣皂素具有抗癌、抗炎和避孕等生物活性,是多数甾体激素药物和甾体避孕药的原料^[24]。薯蓣皂素的主要来源是黄姜中的薯蓣皂苷,薯蓣皂苷主要包括呋甾烷型甾体皂苷和螺甾烷型的甾体皂苷。呋甾烷型甾体皂苷的水溶性较好,在 C3 和 C26 位分别连接有糖链,C26 位的糖苷键很容易降解而生成相应的螺甾烷型皂苷。螺甾烷型皂苷水溶性差,只在 C3 位上连接有糖链,水解该位的糖苷键即可得薯蓣皂素,但在高温高压状态下由强酸水解该糖苷键会产生大量废水。雷晶等^[25]首次报道了利用烟曲霉及其粗酶水解黄姜皂苷生产薯蓣皂素的方法,该法克服了现有生产法的弊端,为皂素生产提供新的思路。

3.2 氧化还原反应 柠檬烯属单环单萜,具有治疗癌症、中和胃酸和溶解胆结石等作用。通过微生物对柠檬烯进行生物转化来制备单萜芳香产品^[26],是具有重要应用前景的新产品开发方法。其转化反应涉及到除 10 位甲基外的所有位置,已知产物多达几十种,其中氧化产物占绝对的优势,如 *Penicillium citrinum* 对 *D*-柠檬烯进行羟基化得到有消毒和杀菌作用的松油醇, *Gongronella butleri* 催化氧化 *D*-柠檬烯得到具抗肿瘤作用的紫苏醇^[27]。

3.3 羟基化反应 二萜类化合物具有抗肿瘤、抗炎及调节免疫等生物活性,是一类广泛分布的重要天然产物。临床疗效较好的紫杉醇和丹参酮等药物均为二萜类化合物,新二萜类化合物的出现将会进一步扩大天然活性先导化合物的来源^[28]。通过微生物多种酶的作用,可以实现二萜类化合物的单个位点或多个位点羟基化。如亚麻镰孢霉可将香紫苏醇转化为(1 β)-羟基香紫苏醇和(12*S*)-羟基香紫苏醇,而该反应难以通过化学方法实现^[7]。

3.4 糖基化反应 糖基化通常是植物或微生物中天然产物生物合成的最后一步。研究表明^[29],黄绿蜜环菌能催化对羟基苯甲醇合成天麻素,该过程实际是糖基转移酶或糖苷转移酶参与的转糖基反应。糖基转移酶有很强的专一性,不同糖基的转移由特异性不同的转移酶完成,即使转移相同糖基,由于糖基受体不同,形成的糖苷键也会不同。糖基化还可促使水不溶或溶解性不好的化合物转化为水溶性化合物。

4 展望

微生物转化技术凭借独特的优势,在中药研究中所发挥的作用已得到众多肯定。但是由于中药成分复杂,中药现代化历程较短,新药审批条件苛刻等原因,目前微生物转化技术在中药领域的应用还停留在药效学和转化机制等研究的初级阶段,该技术尚未应用于中药的大规模工业化生产。所以要充分与基因工程技术等先进技术相结合选育和构建高效菌株,深入研究微生物转化机制,提高活性成分的分离纯化能力,并最终高效地得到高活性低毒性的目的产物,实现微生物转化技术应用于中药生产的目标。总之,微生物转化技术在中药领域的应用前景十分广阔,值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Jonathan S Dordick, Douglas S Clark. Biocatalysis and biotransformation [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6(2):123.
- [2] 郑丽娜, 张明春. 中药有效成分的酶法生物转化[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(10):2556.
- [3] Li M X, Zhu H Y, Yang D H, et al. Production of secoisolariciresinol from defatted flaxseed by bacterial biotransformation [J]. *J Appl Microbiol*, 2012, 113(6):1352.
- [4] 贺赐安, 余旭亚, 孟庆雄, 等. 生物转化对天然药物进行结构修饰的研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(6):843.
- [5] 张怡轩. 真菌在中药成分转化中的应用[J]. *菌物研究*, 2006, 4(4):77.
- [6] Bicas J L, Fontanille P, Pastore G M. Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads [J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 105(6):1991.
- [7] 张翔, 胡昌华. 二萜类化合物微生物转化研究进展[J]. *化学工程与装备*, 2010(5):115.
- [8] Smanski M J, Peterson R M, Huang S X, et al. Bacterial diterpene synthases: new opportunities for mechanistic enzymology and engineered biosynthesis [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, 16(1/2):132.
- [9] 曾二丽, 黄兵, 孙石. 固定化微生物与游离菌净化 SO₂ 性能的初步对比实验[J]. *昆明理工大学学报:理工版*, 2005, 30(1):61.
- [10] 侯晓峰, 郑庆红, 漆小梅, 等. 球形红细菌生物转化槲寄生中总三萜类化合物的测定[J]. *中国医药导报*, 2011, 35(8):31.
- [11] 张琪, 王秀伶, 王世英, 等. 牛瘤胃分离菌株静息细胞培养体系生物转化黄豆苷原[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(1):35.
- [12] 刘婧, 陈启和. 黄绿蜜环菌生物催化白桦脂醇合成白桦脂酸的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2011:38.
- [13] 郭明, 胡昌华. 生物转化-从全细胞催化到代谢工程[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(4):110.
- [14] 彭艳红, 张梁, 丁重阳, 等. 重组桔草芽胞杆菌不对称还原产 *d*-伪麻黄碱[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(7):1082.
- [15] 孙敏鸽, 康宁, 段文娟, 等. 荨麻青霉对莜术醇的微生物转化[J]. *沈阳药科大学学报*, 2007, 24(8):512.
- [16] 游松, 尤凯, 王旭, 等. 白藜芦醇苷的提取纯化及其生物转化[J]. *沈阳药科大学学报*, 2009, 26(4):312.
- [17] 郭继强, 朱殿生, 谭慧. 假单胞菌转化喜树碱的初步研究[J]. *食品科技*, 2010, 35(1):42.
- [18] 唐圆圆, 刘谦, 张景红. 生物技术在雷公藤减毒增效中的应用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(9):214.
- [19] 孙鹏, 李玲, 吴丽, 等. 基于生物转化的附子减毒增效考察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(22):16.
- [20] 汤树良. 人肠道菌对人参皂苷的代谢及相关产物的抗变态反应活性[J]. *国外医学:中医中药分册*, 2003, 25(6):349.
- [21] 肖娟, 王莹, 王新宏, 等. 中药化学成分肠道菌群代谢的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(5):247.
- [22] Srisilam K, Veeresham C. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism[J]. *Biotechnol Adv*, 2003, 21(1):3.
- [23] 郭永超, 林哲绚, 罗文鸿. 短刺小克银汉霉菌对马兜铃酸 A 的代谢转化[J]. *药物生物技术*, 2006, 13(6):451.
- [24] Dong Y S, Teng H, Qi S S, et al. Pathways and kinetics analysis of biotransformation of *Dioscorea zingiberensis* by *Aspergillus oryzae* [J]. *Biochem Eng J*, 2010, 52(2/3):123.
- [25] 雷晶, 黄文, 李天宏. 黄姜皂苷水解烟曲霉的分离及其 β -糖苷酶性质初探[J]. *北京大学学报:自然科学版*, 2011, 47(5):929.
- [26] Rottava I, Cortina P F, Martello E, et al. Optimization of α -terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene and (-)- β -pinene [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 164(4):514.
- [27] 李厚金, 蓝文健. 天然单萜柠檬烯的微生物转化[J]. *化学进展*, 2011, 23(11):2318.
- [28] Fraga B M, Alvarez L, Suárez S. Biotransformation of the diterpenes epicandicandiol and candicandiol by *Mucor plumbeus* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(3):327.
- [29] 刘晓杰, 董亚晨, 冯宇, 等. 黄绿蜜环菌生物转化合成天麻素体系的葡萄糖基转移酶初步研究[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(10):120.

[责任编辑 邹晓翠]